

Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais

Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages

Danielle Carpiné¹
João Luiz Andreotti Dagostin²
Herta Stutz Dalla Santa³
David Chacón Alvarez⁴
Nelcindo Nascimento Terra⁵
Osmar Roberto Dalla Santa⁶

Resumo

Algumas cepas de bactérias lácticas de produtos cárneos fermentados sintetizam proteases e lipases. Estas enzimas contribuem para a formação do aroma e promovem alterações desejáveis na textura e *flavour* do produto. O objetivo desta pesquisa foi verificar a atividade proteolítica e lipolítica de 46 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea. A atividade proteolítica foi testada em dois meios contendo caseína e extrato de carne. Para os ensaios de verificação de lipólise também foram utilizados dois meios diferenciais usando o Ágar Base Tributirina, um com adição de Tributirina e o segundo meio com adição de banha de porco. A atividade enzimática foi mensurada pela formação de halos ao redor de colônias isoladas. Das cepas avaliadas mais de 80% apresentaram atividade proteolítica, enquanto que nenhuma das cepas apresentou atividade lipolítica.

Palavras-chave: bactérias lácticas; proteólise; lipólise.

-
- 1 Engenheira de Alimentos; Mestranda em Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná, UFPR; E-mail: danicarpine@hotmail.com
 - 2 Engenheiro de Alimentos; Mestrando em Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná, UFPR; E-mail: joaodagostin@hotmail.com
 - 3 Dra.; Bióloga; Professora do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO; E-mail: hdalsanta@yahoo.com
 - 4 MSc.; Engenheiro Químico; Professor do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO; E-mail: dchacon@unicentro.br
 - 5 PhD.; Farmacêutico; Professor do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM; Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq; E-mail: nelcindo@terra.com.br
 - 6 Dr.; Biólogo; Professor do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO; E-mail: ordallasanta@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 08/09/2008 e aceito em 05/05/2010

Ambiência Guarapuava (PR) v. 6 n. 1 p. 125 - 132 Jan./Abr. 2010 ISSN 1808 - 0251

Abstract

Some strains of lactic acid bacteria in meat products have the ability to synthesize proteases and lipases, enzymes which contribute for the development of the flavor and promote desirable texture alterations of the product. The objective of this research was to verify the lipolytic and proteolytic activity of 46 lactic acid bacteria strains, isolated from fermented sausages obtained from spontaneous fermentation. The proteolytic activity was tested in different medium supplemented with casein and meat extract. For the lipolytic assays Tributyrin Agar Base supplemented with tributyrin and pork fat were both used. The enzymatic activity was measured by zone formation around the isolated colonies. Among the evaluated strains more than 80% demonstrated proteolytic activity, however none of the strains presented lipolytic activity.

Key words: lactic acid bacteria; proteolysis; lipolysis.

Introdução

Até a década de 40, os salames eram produzidos de maneira artesanal, sem adição de *starter*. O conhecimento dos processos químicos e biológicos que envolvem a fermentação e maturação dos produtos cárneos possibilitou o desenvolvimento de culturas microbianas à base de bactérias lácticas para adição nos salames (FERNÁNDEZ et al., 2000). Estas bactérias são usadas como culturas iniciadoras para acelerar o processo de maturação, e são responsáveis pela maior parte do processo fermentativo, fornecendo produtos com boa qualidade sanitária e características sensoriais adequadas (LEROY; VUYST, 2004; BALDUINO; OLIVEIRA; HAULY, 1999).

O grupo das bactérias lácticas mais utilizado em processos de fermentação alimentícia engloba os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (ZAPELENA et al., 1999; STILES; HOLZAPFEL, 1997). De modo geral,

Lactobacillus, *Streptococcus* e bactérias lácticas pertencentes à família Micrococcaceae, do gênero *Micrococcus* podem ser proteolíticas, já *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Clostridium* apresentam atividade lipolítica (TERRA; FRIES; TERRA, 2004;).

A proteólise resultante da atividade das bactérias lácticas promove liberação de aromas voláteis, aumento da maciez da carne, alterações desejáveis na textura do produto e aceleração do processo de secagem (LEROY; VUYST, 2004; ZAPELENA et al., 1999). Já a lipólise em salames vem sendo amplamente estudada (KENNEALLY et al., 1998; DAINITY; BLOM, 1995), e envolve a liberação de ácidos graxos cujo papel no desenvolvimento do *flavour* não foi ainda totalmente elucidado, pelo grande número de reações envolvidas (FERNÁNDEZ et al., 2000; ORDÓÑEZ et al., 1999). Cadeias curtas de ácidos graxos possuem sabor azedo, mas suas características sensoriais diminuem com o aumento do tamanho da cadeia carbônica (FORSS, 1972).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade proteolítica

e lipolítica de 46 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais produzidos por fermentação espontânea.

Material e Métodos

Isolamento das cepas de bactérias lácticas

Para isolar as cepas de bactérias lácticas, foram coletadas amostras de salames artesanais elaborados por fermentação espontânea, fabricados por pequenas indústrias cárneas do sul do Brasil. As cepas de bactérias lácticas foram isoladas em placas com Ágar De Man, Rogosa e Sharp (MRS) adicionado de azul de anilina para diferenciação das colônias. As colônias selecionadas foram repicadas em tubos com ágar MRS inclinado, incubadas em estufa por 48 h a 35°C e depois armazenadas sob refrigeração para os estudos de caracterização. Estas cepas foram reativadas a cada quatro semanas. As cepas isoladas também foram cultivadas em caldo MRS por 24 h a 35°C sendo, posteriormente, adicionadas de 20% de glicerol estéril e armazenadas a -18°C em tubos Eppendorf. Estas cepas foram reativadas a cada seis meses (SAMELIS et al., 1998).

Determinação da morfologia celular e reação de Gram das cepas das bactérias lácticas

A morfologia das células, juntamente com a coloração de Gram foi verificada pela visualização direta ao microscópio, pelo método tradicional de coloração de Gram (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996). Cada cepa examinada, inicialmente, foi propagada duas vezes em caldo MRS e as culturas *overnight* foram utilizadas como inóculo para os testes de identificação

e verificação da atividade proteolítica e lipolítica (SAMELIS; MAUROGENAKIS; METAXOPOULOS, 1994).

Determinação da atividade proteolítica e lipolítica

Para verificar a atividade proteolítica das cepas de bactérias lácticas foram utilizados dois meios seletivos. O primeiro meio (P1) foi preparado segundo Collins e Lyne (1976) com pequenas modificações, onde a solução de leite em pó foi preparada e esterilizada por cinco minutos a 121°C separadamente e, depois, foi adicionada em meio Ágar Padrão para Contagem (PCA) previamente esterilizado e resfriado a 45-50°C. O segundo meio (P2) foi preparado de acordo com o descrito por Ben-Gigerey et al. (2000).

Para verificar a atividade lipolítica, foram preparados dois meios seletivos, tendo como base 23,0 g de Ágar Base Tributirina para 990 mL de água destilada, aquecido até ebulição, resfriado a 70°C. No primeiro meio (L1) foi adicionado 1,0% de Tributirina (v/v), conforme metodologia descrita por Ben-Gigerey et al. (2000). No segundo meio (L2) foi adicionado 1,0% de banha de porco (p/v) baseado em metodologia descrita por Kenneally et al. (1998) com pequenas modificações. Em seguida, cada um dos meios foi emulsionado por agitação mecânica com mixer doméstico (Walita RI1363) por dois minutos, o pH do meio foi ajustado a 6,5 e autoclavado a 121°C por quinze minutos.

As cepas das bactérias lácticas inicialmente foram reativadas por dois cultivos sucessivos em tubos com 5 mL de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), incubados por 12-14 h a 37°C. As placas contendo os diferentes meios de cultura foram inoculadas com 0,1 mL das diluições 10^{-7} - 10^{-8} da solução das cepas das bactérias lácticas reativadas.

Para o perfeito espalhamento da suspensão das células foram utilizadas pérolas de vidro esterilizadas. As placas com os meios (P1) e (P2) utilizadas para verificar a atividade proteolítica foram incubadas por três dias a 35°C. As placas com os meios (L1) e (L2) utilizadas para verificar a atividade lipolítica foram incubadas por sete dias a 37°C. Os resultados positivos foram verificados pela formação de halos ao redor das colônias, pela mudança de coloração do meio devido à degradação de substâncias contidas nos diferentes meios utilizados.

Resultados e Discussão

Morfologia e reação de Gram das cepas de bactérias lácticas isoladas

Foram isoladas 46 cepas de bactérias lácticas das amostras de salames artesanais. Todas as cepas apresentaram a forma de bacilo e no teste de coloração de Gram os isolados desenvolveram reação positiva. Estas características são comuns ao grupo das bactérias lácticas (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Foram observadas variações no tamanho dos bacilos entre as cepas avaliadas, indicando a presença de várias espécies ou linhagens diferentes de *Lactobacillus* nas amostras de salames obtidos por fermentação espontânea.

Atividade proteolítica das cepas de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais

A atividade proteolítica, verificada pela mudança de coloração do meio ao redor das colônias de bactérias, foi observada de modo diferenciado nos meios (P1) e (P2), entretanto, quatro das cepas testadas não apresentaram

crescimento em nenhum dos meios. Para o meio (P1), enriquecido com leite em pó, houve formação de halos mais escuros ao redor de colônias isoladas e no meio (P2) houve formação de halos mais claros que o meio. Em ambos os meios de cultura, a mudança de cor ocorreu devido à degradação de compostos mais complexos, como por exemplo, a hidrólise da caseína e o extrato de carne.

Neste estudo foi verificado que o total de cepas com atividade proteolítica foi superior a 84%, sendo que 86% das cepas de bactérias lácticas apresentaram atividade proteolítica quando cultivadas no meio (P1) e 84% das cepas cultivadas no meio (P2). A formação de aminoácidos livres e polipeptídeos devem-se à ação proteolítica bacteriana ou endógena no salame (ZAPELENA et al., 1999). A liberação de aminoácidos livres participa diretamente da formação do sabor básico de alimentos fermentados, e indiretamente contribuem para a formação do desenvolvimento de aromas típicos, pois, estas moléculas são precursoras dos compostos voláteis como ácidos, álcoois, aldeídos, amônia, compostos sulfurados ésteres, entre outros (HERRANZ et al., 2003; SAMELIS et al., 1994).

Vale ressaltar que as informações na literatura são escassas quanto a verificação de atividade proteolítica de bactérias lácticas. Papamanoli et al. (2003) avaliaram a atividade proteolítica de bactérias lácticas e verificaram que, das sete cepas de *L. plantarum*, todas apresentaram atividade proteolítica em caseína, mas não em meio de carne cozida. O mesmo ocorreu para as 24 cepas de *L. curvatus*; entretanto, para as cepas de *L. sakei* foi observado hidrólise da caseína em 73% das cepas avaliadas.

Atividade lipolítica das cepas de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais

Em relação à atividade lipolítica, das 46 cepas de bactérias lácticas testadas, todas apresentaram resultado negativo para a atividade lipolítica nos meios utilizados neste estudo. Este resultado era esperado, pois, as espécies de *Lactobacillus* apresentam fraca atividade lipolítica (PAPON; TALON, 1988; REUTER, 1975). As principais espécies de bactérias lipolíticas importantes na elaboração de salames pertencem ao gênero *Micrococcus* e *Staphylococcus* (DEBEVERE et al., 1976; CANTONI et al., 1967).

No estudo realizado por Kenneally et al. (1998), foram testadas cepas de *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus* das quais, somente os dois últimos gêneros apresentaram espécies produtoras de lipases. Estes autores também verificaram que nenhuma das sete cepas de *Lactobacillus* testadas apresentou atividade lipolítica.

A atividade da lipase é sensível a decréscimos no pH, sendo que a maioria das lipases bacterianas possuem alta atividade em pH neutro ou levemente alcalino (ADAMS; BRAWLEY, 1981). Kenneally et al. (1998) obtiveram resultados onde a atividade lipolítica de *Staphylococcus xylosus* foi máxima em valores de pH próximo à neutralidade, entretanto não houve atividade lipolítica nas condições de produção do salame (3,5% de sal, pH 5,0 e 20°C).

A caracterização de cepas isoladas de salames é uma etapa importante, pois permite

selecionar linhagens com características adequadas, que podem então ser utilizadas como *starter* na produção de salames. A utilização de cepas selecionadas propicia a elaboração de produtos de alta qualidade, com sabor característico, presença de compostos aromáticos (aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, etc.) e textura macia. Uma das características que devem ser analisadas é a presença de possível atividade proteolítica e lipolítica que favorecem o desenvolvimento de *flavour* e melhorias na textura do produto.

Conclusão

Na verificação de atividade proteolítica e lipolítica de 46 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames fermentados, sem adição de *starter*, foram observadas diferenças no crescimento e formação de halos entre os meios testados. O total de cepas com atividade proteolítica foi superior a 80%. Em relação à atividade lipolítica nenhuma cepa apresentou ação sobre a gordura suína ou a tributirina. Os resultados obtidos no presente trabalho relativos à atividade enzimática das bactérias lácticas possibilitarão, em conjunto com outras análises de caracterização e identificação, a seleção de cepas para uso como *starter* de salames em pesquisas futuras.

Agradecimento

CARPINÉ, D. agradece à UNICENTRO pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Referências

ADAMS, D. M.; BRAWLEY, T. G. Factors influencing the activity of a heat resistant lipase of *Pseudomonas*. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 677–679, 1981.

- BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Cultura lática mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, 358-362, 1999.
- BEN-GIGIREY, B.; VIEITES, J. M.; VILLA, T. G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 19-31, 2000.
- CANTONI, C.; MOLNAR, M. R.; RENON, P.; GIOLITTI, G. Lipolytic micrococci in pork fat. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 30, p. 190-195, 1967.
- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M. **Microbiological methods**. London: Butterworths, 1976.
- DAINTY, R.; BLOM, H. **Flavour Chemistry of Fermented Sausages**. Fermented Meals, (Campbell-Platt, G., Cook, P.E. eds). Londres: Blackie Academic & Professional p. 176-193, 1995.
- DEBEVERE, J. M.; VOETS, J. P.; DE SCHRYVER, F.; HUYGHEBAERT, Lipolytic activity of *Micrococcus* sp. isolated from a starter culture in pork fat. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 9, p. 160-162, 1976.
- FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; DE LA HOZ, L. Accelerated ripening of dry sausages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2000.
- FORSS, D. A. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**. (ed.) HOLMAN, R. T. Oxford: Pergamon Press, 1972. 177p.
- HERRANZ, B.; FERNÁNDEZ, M.; HIERRO, E.; BRUNA, J. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; DE LA HOZ, L. Use of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NCDO 763 and α -ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 151-163, 2003.
- KENNEALLY, P. M.; LEUSCHNER, R. G.; ARENDT, E. K. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 839-846, 1998.
- LEROY, F.; VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.
- ORDÓÑEZ, J. A.; HIERRO, E. M.; BRUNA, J. M.; DE LA HOZ, L. Changes in the Components of Dry-fermented Sausages During Ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, 1999.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P.; Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.

PAPON, M.; TALON, R. Factors affecting growth and lipase production by meat Lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 64, p. 107-115, 1988.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. v. 1, 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

REUTER, G. **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods** (ed. J. C. Garr, C. V. Cutting e G. C. Whiting). Londres: Academic Press, 1975. 221p.

SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 179-196, 1994.

_____; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 69-82, 1998.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Editora Livraria Varela, 2004. 152 p.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional, v. 2, 1995. 398p.

ZAPELENA, M. J.; ASTIARARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture. **Meat Science**, v. 52, p. 403-409, 1999.